Olaf Wetlitzky

Klinische Wertigkeit von In- vitro- Resistenztestungen menschlicher Tumoren und konsekutiver Stoffwechseluntersuchungen vor und nach Chemotherapie

Diss München
1983

2023

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544308_0044

Aus der Medizinischen Klinik III im Klinikum Großhadern
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. W. Wilmanns

Klinische Wertigkeit von In- vitro- Resistenztestungen menschlicher Tumoren und konsekutiver Stoffwechseluntersuchungen vor und nach Chemotherapie

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Olaf W e t l i t z k y

aus

Göggingen/Kreis Augsburg

München 1983

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Ehrhart

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Wilmanns

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. 12. 1983

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
1. Historischer Überblick über die entwickelten Testverfahren	3
2. Prüfung eines Resistenztestes in einer retrospektiven Studie	8
2.1. Einleitung	8
2.2. Material	13
2.3. Methodik	16
2.4. Ergebnisse	22
2.5. Diskussion	39
3. Sicherung des Resistenztestes in einer prospektiven Studie	43
3.1. Einleitung	43
3.2. Material	44
3.3. Methodik	45
3.4. Ergebnisse	47
3.5. Diskussion	49

Seite

4. Konsekutive Stoffwechseluntersuchungen vor und nach Chemotherapie 51

4.1. Einleitung 51
4.2. Material 54
4.3. Methodik 55
4.4. Ergebnisse 57
4.5. Diskussion 62

Zusammenfassung 64

Literaturverzeichnis 67

Einleitung

In den letzten zehn bis fünfzehn Jahren ist es durch systematische tierexperimentelle und zellbiologische Untersuchungen gelungen, große Erfolge auf dem Gebiet der Chemotherapie maligner Tumoren zu erzielen. Neu eingeführte Medikamente verbesserten die Remissionsraten bei bestimmten Tumoren zum Teil erheblich. Es ist jedoch bekannt, daß Tumoren trotz gleicher Histologie und Lokalisation oft unterschiedlich gegenüber dem gleichen Medikament reagieren (9, 32, 68, 81).

Im Individualfall ist daher die Wirksamkeit einer zytostatischen Therapie nicht vorhersehbar. Dies wäre jedoch schon deshalb wichtig, weil die zytostatische Behandlung mit nicht unerheblichen Nebenwirkungen behaftet ist. So treten fast immer zentralnervöse Störungen wie Erbrechen, Schwindelgefühl und Katerstimmung auf, die heute allerdings weitgehend medikamentös beherrschbar sind. Weiterhin werden normale proliferative Gewebe stark beeinflußt, was sich besonders in Knochenmarksdepression mit peripherer Leukopenie und Thrombozytopenie mit nachfolgenden Infekten und hämorrhagischen Zuständen, in Durchfällen (durch Schädigung der Darmschleimhaut) und Haarausfall (durch Haarbettschädigung) äußert. Substanzspezifische Nebenwirkungen wie die hämorrhagische Zystitis nach Cyclophosphamidbehandlung und neurotoxische Effekte nach der Gabe von Vincaalkaloiden sind eben-

falls zu erwähnen (56,57). Schließlich wiesen SCHMÄHL und KONDO darauf hin, daß Zytostatika das Tumorwachstum sogar beschleunigen können, wenn das Medikament unwirksam gegen den Tumor ist (25, 57).

Ausgehend von dieser Problematik wurden schon bald nach Einführung der Krebschemotherapie zahlreiche Versuche angestellt, bereits prätherapeutisch durch In-vitro-Teste das Tumorverhalten in vivo vorauszusagen.

Aufgabe der folgenden Arbeit nach Darstellung eines historischen Überblicks über die bisher entwickelten Testverfahren war es, einen hier entwickelten In-vitro-Test in einer retrospektiven Studie zu prüfen, die daraus gewonnenen Erkenntnisse auf eine prospektive Studie zu übertragen und mit Hilfe eines In-vitro-Testes die Wirksamkeit einer Chemotherapie 24 h nach Zytostatikaapplikation festzustellen.

1. Historischer Überblick über die entwickelten Testverfahren

Um Zytostatika im Hinblick auf ihre wachstumshemmende Wirkung auf Tumorzellen zu untersuchen, gibt es prinzipiell zwei Methoden:

a) die Anzüchtung von Tumorzellen in der Gewebe- und Organkultur

und

b) die Kurzzeitinkubation von Tumorzellen.

Anfänglich fand vor allem die Anzüchtung von Tumorzellen in der Gewebekultur Verwendung. Sie folgt - mit einigen Abwandlungen verschiedener Autoren - immer dem gleichen Prinzip:

Aus malignen Höhlenergüssen werden durch Zentrifugation, aus solidem Tumormaterial durch mechanische Zerkleinerung die Tumorzellen isoliert und in einem zytostatikahaltigen Nährmedium über längere Zeit kultiviert. Die Wirksamkeit des Medikaments wird nach unterschiedlichen Kriterien beurteilt.

WRIGHT (1957), COBB (1961), TOPLIN (1961) sowie LIMBURG und KRAHE (1964) benutzten vor allem histologische und zytologische Veränderungen, wie Granulation, Pyknose,

Cytolyse, angewachsener Zellschutt, Kernveränderungen, Reduktion der Mitosen und chromosomale Fehler, um auf die Wirksamkeit eines Zytostatikums zu schließen (10,32,64,82).

Die Anwendung morphologischer Parameter bei der Beurteilung zytostatischer Effekte bringt methodisch bedingt ungenaue und fehlerhafte Ergebnisse. Deshalb wurde sehr bald versucht, objektivere Kriterien für die Beurteilung der Wirksamkeit einer zytostatischen Substanz heranzuziehen.

EAGLE und FOLEY (1956) bestimmten den gegenüber den unbehandelten Kontrollen veränderten Proteingehalt der unter dem Einfluß von Antitumorsubstanzen wachsenden Zellpopulationen (14).

MCALLISTER (1959) stellte die durch Zytostatika verminderte Bildung von sauren Zellstoffwechselmetaboliten durch Messung des pH-Wertes fest (38).

Mit Hilfe der Entfärbung von Methylenblau als Indikator untersuchten DIPAOLO (1963) und KNOCK (1965) eine Veränderung der Dehydrogenaseaktivität in den in der Kultur wachsenden Zellen (12,27).

Einen prinzipiell ähnlichen Test entwickelte auch KONDO (1966). Er bestimmte die unter dem Einfluß von zytostatischen Substanzen veränderte Aktivität der Succinyldehydrogenase; als Zeichen für die Aktivität diente dabei die Umsetzung von Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) in Formazan. Dieser Test ist in der Literatur auch als SDI-Test bekannt (25,28).

HOLMES (1974) nahm die Verminderung der Zahl an lebenden Zellen, die er mit einer Färbeausschlußtechnik feststellte, als Maß für die Wirksamkeit einer Antitumorsubstanz (24).

Das methodische Vorgehen von SALMON (1978), HAMBURGER (1978) und ALBERTS (1980) weicht etwas von dem in den bisher erwähnten Arbeiten ab. Die Tumorzellen werden nach einer Vorinkubation mit Zytostatika auf ein auf Platten befindliches Nährmedium übertragen. Die Autoren verglichen die Zahl der aus den aufgebrachten Zellen hervorgegangenen Kolonien mit der unbehandelter Kontrollen. Dieses als "Klonierung von Tumorstammzellen" bezeichnete Verfahren (1,19,51) wird inzwischen auch von anderen Autoren angewendet (2).

Alle bisher aufgeführten Verfahren haben den Nachteil, daß sie sehr zeitaufwendig sind. Deshalb wurden sehr bald Versuche mit Kurzzeittesten angestellt. Das experimentelle Vorgehen soll hier kurz erläutert werden.

Die Tumorzellen werden unter Zytostatikaeinfluß präinkubiert. Anschließend werden radioaktiv markierte Zellstoffwechselpräkursoren, meist Bausteine der DNS- bzw. RNS-Synthese zugefügt, denn die Nukleinsäuresyntheserate stellt ein Maß für die proliferative Aktivität eines Tumors dar und ist der Hauptangriffspunkt der meisten heute üblichen Zytostatika (59,75,78). Eine gegenüber den Kontrollansätzen verminderte Einbaurate wird mit Hilfe der Szintillationstechnik gemessen.

BICKIS und HENDERSON (1966) verwendeten für ihre Untersuchungen 14C-markierte Aminosäuren (9).

Mit Uridin und Thymidin, d.h. Bestandteilen der DNS bzw. RNS, als Markern arbeiteten SEIDEL (1969), KUMMER (1970), VOLM (1970), WÜST (1970), BASTERT (1975) und POSSINGER (1976) (4,29,30,44-46,67-76,83). VOLM und Mitarbeitern gelang es auch den Nachweis zu führen, daß die Ergebnisse von Kurz- und Langzeittesten vergleichbar sind (70).

Um den Einbau von Stoffwechselmarkern festzustellen, benutzten WOLBERG und BROWN (1962) ein autoradiographisches Untersuchungsverfahren (81). Hierbei wird mit Hilfe einer auf die Zellen aufgebrachten Filmschicht die Zahl der markierten Zellen bestimmt. Dieser Wert wird als Markierungsindex oder "labeling index" LI bezeichnet. Eine Änderung des LI um den Faktor 1,9 gegenüber unbehandelten Kontrollen zogen LIVINGSTON und Mitarbeiter (1980) als Maß für die Wirksamkeit einer Antitumorsubstanz heran (33,34).

Als letzte Methode ist schließlich die Transplantation von menschlichem Tumormaterial auf immunsuppremierte Ratten bzw. Mäuse und eine anschließende Behandlung der in den Tieren wachsenden Tumoren mit den zu testenden Zytostatika zu nennen. Sie wurde erstmals von HECKMANN (1967) beschrieben (21). BATEMAN (1979) stellte eine gute Korrelation dieses Tests mit den Ergebnissen an Zellkulturen fest (5).

Abschließend ist zu sagen, daß sich die weitaus größere Anzahl der hier angeführten Verfahren darum bemüht, die in vivo wirksamen Antitumorsubstanzen herauszufinden, d.h. es handelt sich um Sensibilitätsteste. Nur wenige Arbeiten beschäftigen sich mit dem umgekehrten Verfahren, nämlich in vivo unwirksame Substanzen festzustellen. Dieser Unterschied ist aber, wie bei der Besprechung des hier entwickelten Resistenztestes und seiner Ergebnisse im nächsten Kapitel zu sehen sein wird, von grundsätzlicher Bedeutung.

2. Prüfung eines Resistenztestes in einer retrospektiven Studie

2.1. Einleitung

Die im obigen Abschnitt der Arbeit erwähnten Untersuchungen an Gewebekulturen brachten beachtliche Ergebnisse. So berichtete WRIGHT, daß in 65 % der Fälle das In-vitro- mit dem In-vivo-Resultat übereinstimmte (82). Nach Angaben KONDOS lag die richtig positive Vorhersagerate einer Zytostatikasensibilität beim SDI-Test im Mittel bei 69 % (25). Zwischen 62 und 65 % lagen die Werte, die von SALMON, ALBERTS sowie BALLON mit Hilfe der Klonierung von Tumorstammzellen erzielt wurden (1,2,53).

Dennoch müssen eine Reihe von Nachteilen dieser Untersuchungen erwähnt werden. So können nicht alle vorkommenden malignen Tumoren in der Kultur gezüchtet werden. Die Angehrate von Tumorzellen in der Kultur liegt nach Angaben verschiedener Autoren zwischen 23 % und 85 % (8,19). COURTENAY (1978) wies darauf hin, daß sich insbesondere bindegewebsreiche Tumoren, wie z.B. szirrhöse Mammakarzinome nicht züchten lassen und betont, daß vor allem bei einem Primärtumor mit teilweise differenzierten Zellpopulationen einem beträchtlichen Anteil dieser Zellen die Fähigkeit der Koloniebildung in der Kultur fehlt (11).

Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, daß besonders an die Bedingungen der Kultur angepaßte, aber für den Tumor nicht mehr repräsentative Zellen wachsen (4,7,11,15,67).

COBB und Mitarbeiter (1961) konnten zeigen, daß sich Serienbiopsien aus demselben Tumor gegenüber einem Zytostatikum in der Kultur unterschiedlich verhielten (10).

Dieses Ergebnis wurde in einer Arbeit von HEPPNER und Mitarbeitern (1978) erhärtet. Sie isolierten aus einem Adenokarzinom der Mamma drei verschiedene Zellinien, die sich in der Kultur durch eine völlig unterschiedliche Sensibilität gegenüber den getesteten Medikamenten auszeichneten. Auch ihr In-vivo-Verhalten, das mit Hilfe von Tumortransplantaten in Mäusen untersucht wurde, war different (22). Darüberhinaus wies TSURUO (1981) mit Hilfe der Klonierungstechnik eine unterschiedliche In-vitro-Sensibilität gegenüber Antitumorsubstanzen von Primärtumor und Spontanmetastasen nach (65).

Als weitere Nachteile sind - insbesondere bei der Klonierungstechnik - die hohen Kosten und der große zeitliche und methodische Aufwand zu erwähnen (68).

Die aufgeführten Kurzzeitteste brachten im Vergleich zu den klinischen Resultaten ebenfalls gute prädiktive Ergebnisse. Nach VOLM und Mitarbeiter (1979) lag die richtig positive Vorhersagerate einer Sensibilität bei 80 % (75).

Ähnliche Werte wurden in einer "Kooperativen Studie für Sensibilitätstestung von Tumoren", die zwischen 1975

und 1979 an mehreren deutschen Universitätskliniken durchgeführt wurde, so wie von SCHMIDT-MATTHIESEN (1977) mit 70 % erreicht (26,58).

LIVINGSTON (1980) konnte mit der Bestimmung des LI in 78 % der Fälle eine positive Korrelation zwischen dem In-vitro- und dem In-vivo Resultat erzielen (34).

Trotz dieser beeindruckenden Ergebnisse müssen die Untersuchungen jedoch kritisch betrachtet werden.

So besteht die Möglichkeit, daß schon bei der Gewinnung einer Einzelzellsuspension aus einem soliden Tumor durch die mechanische Aufbereitung schwere Läsionen an den Zellen erzeugt werden, wodurch ernste Störungen des Stoffwechsels und damit Verfälschungen des Testergebnisses auftreten können.

Ein weiterer Nachteil resultiert aus der bei soliden Tumoren inhomogenen Verteilung proliferativer Zellen (39,83). So zeigten TCHAO und Mitarbeiter (1968), daß Mehrfachproben aus demselben Tumorgewebe in der Aufnahme markierter Stoffwechselpräkursoren starken Schwankungen unterlagen (62). Besonders hoch ist der Anteil wenig proliferativer Zellen in Bezirken relativer Hypoxie (33). Es ist deshalb möglich, daß ein Tumor durch den Kurzzeittest als sensibel eingestuft wird, obwohl in Wirklichkeit nur Zellen aus einem Tumorbezirk mit einem geringen Anteil von proliferativen Zellen untersucht wurden.

Bei der Bestimmung des LI an Gewebeschnitten ist besonders ungünstig, daß mit dieser Methode nur eine be-

grenzte Anzahl von Zellen ausgezählt werden kann und deshalb bei Geweben mit einem niedrigen LI ein beträchtlicher statistischer Fehler droht (83).

Für alle hier angeführten Untersuchungsverfahren gilt schließlich, daß sie die Antitumorsubstanzen unter völlig unphysiologischen Bedingungen auf eine mögliche Wirksamkeit prüfen. Das Medikament kann in vitro mit den Tumorzellen in direkten Kontakt treten - eine Situation, wie sie in vivo praktisch nie vorkommt. Denn für die Verfügbarkeit eines Zytostatikums am Tumor spielen in vivo die Pharmakokinetik, d.h. Resorption, Verstoffwechslung wie z.B. die Aktivierung in der Leber, Verteilung, Eiweißbindung und Ausscheidung eine große Rolle (7,15,17).

Diese Tatsachen belegte eine Untersuchung von YESAIR und Mitarbeitern (1980). Sie verglichen Resorption, Metabolismus und Retention der Anthracyclinderivate Adriamycin und Daunomycin an Transplantationstumoren der Maus in vitro und in vivo. Es zeigte sich, daß die Wirksamkeit der Substanzen von ihrer intrazellulären Konzentration abhängig war und daß Tumoren, die subkutan oder intramuskulär implantiert waren, nur einen kleinen Teil (kleiner als 5 %) der intrazellulären Konzentration in den intraperitoneal implantierten Tumoren aufwiesen, wenn das Medikament intraperitoneal appliziert worden war (85).

Häufig weisen Tumoren auch nekrotische und ischämische Bezirke auf. Diese sind für eine Antitumorsubstanz wegen der schlechten Gefäßsituation kaum oder nicht

erreichbar. Dennoch kann eine Substanz, die sich in vitro nur als schwach wirksam erwies, von großem Nutzen sein, wenn sie die Fähigkeit der Penetration zum Tumor besitzt (15).

Es ist also festzustellen, daß die Vorhersage der Sensibilität eines Tumors gegenüber einem Zytostatikum in den genannten Testsystemen von einer Reihe schwerwiegender Nachteile beeinträchtigt wird.

Im folgenden wird deshalb versucht, eine Aussage über die unwirksamen Medikamente mit Hilfe eines von POSSINGER et al. entwickelten Resistenztests zu treffen. Dieser Test soll nun erläutert werden.

2.2. Material

Zytostatika:
5-Fluorouracil (Fluoro-uracil "Roche "^{R}, La Roche, Grenzach),
Adriamycin (Adriblastin^{R}, Montedison Farma, Freiburg),
Methotrexat (Methotrexat "Lederle "^{R}, Lederle, Wolfratshausen),
4-Hydroperoxycyclophosphamid (Asta- Werke AG, Bielefeld).

Radioaktive Substanzen (Amersham-Buchler, Braunschweig):
3 H- Thymidin (spez. Akt. 5 Ci/mM),
3 H- Uridin (spez. Akt. 8,4 Ci/mM),
3 H- Desoxyuridin (spez. Akt. 14 Ci/mM).

Nährlösung:
TCM 199 (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA).

Mikrotiterplatten (M 220 - 21 ART, Boll, München),
0,2 n Perchlorsäure (Merck, Darmstadt),
0,9 %ige physiologische Kochsalzlösung,
Eppendorfpipetten (Eppendorf, Hamburg),
Glasfilterstreifen (reeve angel, Clifton, New Jersey, USA),
Multiprezipitator-Harvester (Otto Hiller, Madison, Wisconsin,USA),
Filtergaze (Art. Nr. 7-200, Schweizerische Seidengazefabrik AG, Zürich, Schweiz),

TRI-CARB Liquid scintillation Spectrometer (Packard, Frankfurt),
Toluol Szintillationsflüssigkeit (Roth, München),
Zentrifuge CRYOFUGE 6-6 (Heraeus Christ, Osterode),
Zytozentrifuge Cytospin 2 (SHANDON Labortechnik, Frankfurt),
Objektträger.

Autoradiographie-Material:
Aqua dest.
0,5 %ige Gelatine
Ethanol (70 %ig und 96 %ig)
Schneideplatte
Kodak AR 10 Stripping Film (Weisser, München)

Entwicklermaterial (Merck, Darmstadt):
36 g Natrium-Sulfit siccum
9 g Amidol
25 ml Kaliumbromidlsg. 10 %ig
2 l Aqua dest.

Fixierungsmaterial (Merck, Darmstadt):
60 g Kalium-Disulfid
600 g Natrium-Thiosulfat krist.
2 g Curomalaun
2 l Aqua dest.

Tumormaterial:

Eine Übersicht über die Herkunft des untersuchten Tumormaterials gibt die Tabelle 1.

2.3. Methodik

Solides Tumormaterial wurde mechanisch zerkleinert, filtriert und mit der vorgewärmten Nährlösung in eine Einzelzellsuspension überführt. Zur Gewinnung von Zellmaterial aus malignen Höhlenergüssen (Pleuraerguß, Aszites) wurde die Punktionsflüssigkeit 10 Minuten mit 200 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet ebenfalls in Nährlösung aufgelöst. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurde die Tumorzellsuspension auf eine Zellzahl von 200 000/ml eingestellt. Pro Einzelansatz wurden davon 50 µl auf die Mikrotiterpatten übertragen. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 100 µl eines Zytostatikums in drei Konzentrationsbereichen, die der 0,01-, 1- und 100-fach therapeutischen Dosis beim Menschen entsprechen (Tabelle 2).

Um statistische Schwankungen auszugleichen, wurde jeder Konzentrationsbereich in 12 Einzelansätzen getestet.

Als Kontrolle dienten pro Platte 12 Testansätze; sie enthielten kein Zytostatikum.

Nach zweistündiger Inkubation im Brutschrank bei 37^{0} C erfolte die Zugabe von 20 µl der für jedes Medikament spezifischen, radioaktiv markierten Stoffwechselpräkursoren (Tabelle 3). Die Testansätze wurden nun eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurden sie mit Hilfe des Multiprezipitator-Harvester auf Filterstreifen gesogen, mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, um die nicht eingebauten Präkursoren zu extrahieren, und dann mit 0,2 n

Perchlorsäure gefällt. Die Filterstreifen wurden auf einer Trockenbank getrocknet und in die entsprechenden Einzelansätze aufgeteilt. Diese wurden mit einer Pinzette in Szintillationsröhrchen übertragen, denen anschließend 5 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben wurde. Die Messung erfolgte pro Probe 4 Minuten lang im Szintillationsmeßgerät TRI-CARB.

Aus je 12 Einzelansätzen wurde ein Mittelwert errechnet. Die Einbauverminderung in den mit Zytostatika behandelten Testansätzen wird als Prozentwert, bezogen auf die Kontrollansätze, angegeben.

Die Sicherung der Lebensfähigkeit der Tumorzellen während der Versuchsdauer erfolgt alle 30 Minuten durch die Bestimmung der 3H-Thymidinkinetik in einem Doppelansatz. Bei lebenden Zellen muß der Einbau von 3H-Thymidin ständig zunehmen bzw. gleichbleiben.

Um möglichst schnell einen Tumorzellnachweis in der Suspension zu haben, wurden mit Hilfe der Zytozentrifuge Präparate angefertigt und nach der Pappenheimmethode gefärbt.

Zur Sicherung des Einbaus der markierten Präkursoren durch die Tumorzellen werden Autoradiographien nach der Stripping-Methode durchgeführt.

Dazu werden jeweils 50 µl der Tumorzellsuspension mit 20 µl der 3H-Thymidinlösung eine Stunde inkubiert und anschließend mit Hilfe der Zytozentrifuge auf einen Objektträger aufgebracht. Nach Lufttrocknung wird die Rücksei-

te des Objektträgers mit der Gelatine bestrichen, damit später der Film besser haftet.

Die Beschichtung der Präparate mit dem Film erfolgte in der Dunkelkammer. Nachdem die Filmplatte 6 Minuten lang in 70 %igen Ethanol gelegt worden war, wurde der darauf befindliche Film in 8 gleiche Teile zerschnitten. Zur Ablösung des Films wurde die Platte weitere 6 Minuten in 96 %igen Ethanol gelegt, anschließend die Filmabschnitte mit der Pinzette in eine Wanne mit Aqua dest. gelegt und auf die Objektträger aufgebracht. Die Präparate wurden danach 2 Stunden im Trockenschrank gelüftet und schließlich in lichtdichten Bakelitbehältern bei 4^0 C 3 Wochen lang inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Präparate bei völliger Dunkelheit 6 Minuten lang entwickelt, 20 Minuten lang fixiert, sodann 2 Stunden gewässert und anschließend 24 Stunden im Trockenschrank getrocknet. Die Färbung erfolgte mit Giemsa-Lösung.

RETROSPEKTIVE ANALYSE DER IN VITRO TESTERGEBNISSE UND DES KLINISCHEN VERLAUFS UNTER CHEMOTHERAPIE

TUMOR :	Mamma - CA :	n = 59
	Ovarial - CA :	n = 14
	Tumoren anderer Organe :	n = 33
METASTASEN :	Weichteil :	n = 23
	Lymphknoten :	n = 30
	Haut :	n = 21
	Knochen :	n = 31
	Lunge :	n = 12
	Leber :	n = 15
ALTER :	M = 54 (Range : 17 - 76)	
GESCHLECHT :	männlich : n = 21	
	weiblich : n = 85	
VORBEHANDLUNG :	hormonell und zytostatisch :	n = 39
	zytostatisch :	n = 64

Tabelle 1

Therapeutische Dosis beim Menschen

Cytostatika	0,01	1	100
Adriamycin	8×10^{-6}	8×10^{-4}	8×10^{-2}
Methotrexat	1×10^{-5}	1×10^{-3}	1×10^{-1}
5-Fluorouracil	$1,5 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-2}$	1,5
activ. Cyclophosphamid	$1,4 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-2}$	1,4

Testkonzentrationen der verwendeten Cytostatika in mg/ml Nährlösung

Tabelle 2

Cytostatika	3H-Thymidin	3H-Uridin	3H-Desoxyuridin
Methotrexat			+
5-Fluoruracil		+	
Adriamycin	+	+	
aktiv. Endoxan	+	+	

Zuordnung der jeweiligen radioaktiv-markierten Stoffwechselpräkursoren zu den verwendeten Cytostatika

Tabelle 3

2.4. Ergebnisse

In einer Pilotstudie an 10 Tumoren, die zum Testzeitpunkt gegen die eingesetzten Zytostatika klinisch resistent geworden waren, hatten POSSINGER und Mitarbeiter als Kriterium für eine Resistenz in vivo eine maximal 28 %ige Einbauverminderung unter der höchsten im Test angewendeten Konzentration herausgearbeitet (44).

Dieses Kriterium wurde in der Studie nun für die Beurteilung aller in vitro untersuchten Tumoren herangezogen. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 1.

Die gegenüber der Anzahl der untersuchten Tumoren höhere Anzahl von In-vitro-Versuchen erklärt sich damit, daß die Tumoren einiger Patienten dann erneut getestet wurden, wenn sie klinisch wiederum resistent geworden waren.

Von 73 untersuchten metastasierenden Mammakarzinomen waren 43 sowohl in vitro als auch in vivo resistent. 19 Fälle erwiesen sich in vitro und in vivo als sensibel, während es in 11 Fällen, die in vitro als sensibel eingestuft worden waren, zu einer Progredienz kam. Bei den Untersuchungen an 19 metastasierenden Ovarialkarzinomen wurde in 9 Fällen vom In-vitro-Test eine Resistenz vorhergesagt, die sich auch klinisch bestätigte. In 5 Fällen fand sich weder in vitro noch in vivo ein Hinweis für eine Zytostatikaresistenz; weitere 5 Fälle waren zwar in vitro sensibel, zeigten aber ein resistentes Verhalten gegenüber der zyto-

statischen Therapie. Die Untersuchung von 36 metastasierenden Tumoren anderer Organe brachte folgende Ergebnisse: in 23 Fällen korrelierte die Resistenz in vitro mit dem klinischen Verhalten unter der Therapie. 5 Fälle waren sowohl in vitro als auch in vivo sensibel, während es in 8 Fällen, bei denen sich in vitro kein Hinweis für eine Resistenz fand, zu einer Tumorprogression kam. Von den insgesamt 128 untersuchten Tumoren erwies sich in keinem Fall ein Tumor, der in vitro als resistent eingestuft worden war, in vivo als sensibel. Die richtig positive Vorhersagerate einer Resistenz lag somit bei 100 %, die einer Sensibilität nur bei 55 %.

Die Tabellen 4 - 9 geben für die einzelnen Patienten an, gegen welche Substanzen sich der Tumor im Individualfall sowohl in vitro als auch in vivo als resistent bzw. nicht resistent erwies.

Um für die weiteren Untersuchungen genauere Differenzierungsmöglichkeiten in die Hand zu bekommen, wurden aus den gewonnenen Daten getrennt für jedes Zytostatikum für den Fall der Resistenz (R) bzw. der Sensibilität (NR) Dosis-Wirkungsbeziehungen errechnet. Dazu wurden nur diejenigen Fälle herangezogen, bei denen das In-vitro- mit dem In-vivo-Ergebnis übereinstimmte; nicht berücksichtigt wurden die Fälle, die sich in vitro als sensibel, in vivo aber als resistent erwiesen.

Unter 5-Fluorouracil betrug die Einbauhemmung von 3H-Uridin im Fall der Resistenz bei einer Konzentration

von $1{,}5 \times 10^{-4}$ mg/ml 12 ± 21 %,

bei $1{,}5 \times 10^{-2}$ mg/ml 3 ± 7 %,

und bei der höchsten Konzentration

von 1,5 mg/ml 7 ± 11 %.

Die entsprechenden Zahlen lauten im Fall der Sensibilität

5 ± 9 %,

38 ± 30 %

64 ± 11 %. (Abbildung 2).

Unter Methotrexat betrug die Einbauhemmung von 3H-Desoxyuridin im Fall der Resistenz bei einer Konzentration

von 1×10^{-5} mg/ml 8 ± 12 %,

bei 1×10^{-3} mg/ml 10 ± 15 %,

und bei der höchsten Konzentration

von 1×10^{-1} mg/ml 2 ± 3 %.

Die entsprechenden Zahlen lauten im Fall der Sensibilität

20 ± 19 %

43 ± 35 % und

58 ± 17 %. (Abbildung 3).

Unter Adriamycin betrug die Einbauhemmung von 3H-Uridin bzw. 3H-Thymidin im Fall der Resistenz bei einer Konzentration

von 8×10^{-6} mg/ml 4 ± 8 % bzw. 6 ± 12 %,

bei 8 x 10^{-4} mg/ml 8 ± 13 % bzw. 7 ± 13 %,
und bei der höchsten Konzentration
von 8 x 10^{-2} mg/ml 6 ± 10 % bzw. 4 ± 6 %.
Die entsprechenden Zahlen lauten im Fall der Sensibilität
1 ± 1 % bzw. 6 ± 12 %,
48 ± 23 % bzw. 35 ± 16 % und
58 ± 15 % bzw. 58 ± 19 % (Abbildungen 4 und 5).

Unter 4-Hydroperoxycyclophosphamid betrug die Einbauhemmung von 3H-Uridin bzw. 3H-Thymidin im Fall der Resistenz bei einer Konzentration
von 1,4 x 10^{-4} mg/ml 4 ± 8 % bzw. 3 ± 7 %,
bei 1,4 x 10^{-2} mg/ml 11 ± 7 % bzw. 12 ± 17 %,
und bei der höchsten Konzentration
von 1,4 mg/ml 5 ± 8 % bzw. 5 ± 9 %.
Die entsprechenden Zahlen lauten im Fall der Sensibilität
8 ± 11 % bzw. 11 ± 17 %,
43 ± 25 % bzw. 36 ± 11 % und
54 ± 12 % bzw. 50 ± 17 % (Abbildungen 6 und 7).

Die Konzentrationsbereiche entsprechen jeweils der 0,01-, 1- und 100-fachen therapeutischen Dosis. Im Fall der höchsten Konzentration war die Einbauhemmung im Bereich K von der des Bereichs NR für alle Substanzen signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,05$).

RETROSPEKTIVE ANALYSE DER IN VITRO TESTERGEBNISSE UND DES KLINISCHEN VERLAUFS UNTER CHEMOTHERAPIE

TUMOR	Anzahl der Patienten	Anzahl der in vitro Teste	Tumor I R/R	Tumor II R/S	Tumor III S/S	Tumor IV S/R
MAMMA	59	73	43	0	19	11
OVAR	14	19	9	0	5	5
ANDERE	33	36	23	0	5	8
TOTAL	106	128	75	0	29	24

Richtig positiv: (S/S) / (S/S + S/R) x 100 = 55 %
Richtig negativ: (R/R) / (R/R + R/S) x 100 = 100 %

I = Tumor res. in vivo und in vitro
II = Tumor res. in vitro und sens. in vivo
III = Tumor sens. in vivo und in vitro
IV = Tumor sens. in vitro und res. in vivo

Abbildung 1

RETROSPEKTIVE STUDIE: MAMMA-CA

Resistent in vitro/Resistent in vivo

Patient/ Geschlecht/ Alter	5-FU	MTX	ADM	EPI
A.A.;w;51		+	+	
A.E.,w;47		+	+	
A.T.;w;49				+
B.H.;w;52				=
B.I.;w;39		+	+	
B.M.;w;48				+
E.M.;w;49			+	+
E.M.,w;48				+
G.A.;w;66	+	+	+	+
G.E ;w;37	=			
G.H ,w;58				=
G.I .,w.51	+			+
G.R.;w;45		+		
H.B .,w.,37	+	+		=
H.D .w;61		+		
H.E .,w;64		+		
H.J w;64		+		+
H.L w 42		+		
H.T w,74	+		+	
K.E w 53	+	+		=
K.Z..w;54			+	+
K.E. w.70	+		+	+
K.R w;64		+		+
K.R w;67		+		+
L.I w;44			+	+
M.M w;48	+		+	+
M.M w;52			+	
M.N. w;63	+		+	+
M.P..w.;51	+	+		+
P.F..w.76	+	+		
R.G..w;64	+	+		
R.M..w.50			+	+
S.C.;w;54	+	+		+
S.G ;w,50		+	+	+
S.G..w.,51	+	+	+	+
S.G.;w;56			+	
S.K.;w,69	=	+	+	+
W.G ;w;50			+	
W.A. w.74				+
W.E.;w;65	+			+
W.M.;w;43			+	
W.R.;w;63				+
Z E.;w;51		+	=	

Tabelle 4

RETROSPEKTIVE STUDIE: MAMMA-CA

Nicht resistent in vitro/Nicht resistent in vivo

Patient/ Geschlecht/ Alter	5-FU	MTX	ADM	EDX
A.B.;w;55				+
A.T.;w;49		+		
B.E.;w;64			+	
B.H.;w;66	+		+	+
B.K.;w;48			+	
G.R.;w;61			+	+
M.A.;w;44			+	
P.J.;w;55		+		
P.K.;w;66				+
R.G.;w;51		+		
R.M.;w;50		+		
S.E.;w;44				+
S.F.;w;71				+
S.K.;w;59			+	+
W.M.;w;43		+		+
W.T.;w;54	+	+		+
W.W.;w;61			+	+
Z.C.;w;69			+	
Z.E.;w;51	+			

Tabelle 5

RETROSPEKTIVE STUDIE: OVARIAL-CA

Resistent in vitro/Resistent in vivo

Patient/ Geschlecht/ Alter	5-FU	MTX	ADM	EDX
C.M.;w;51	+	+	+	+
K.A.;w;62				+
K.H.;w;54	+		+	+
L.G.;w;45			+	+
P.E.;w;55	+		+	+
R.E.;w;56				+
R.L.;w;44	+			+
S.M.;w;64	+			+
V.M.;w;50			+	+

Tabelle 6

RETROSPEKTIVE STUDIE: OVARIAL-CA

Nicht resistent in vitro/Nicht resistent in vivo

Patient/ Geschlecht/ Alter	5-FU	MTX	ADM	EDX
F.R.;w;71				+
K.K.;w;62	+	+		+
L.B.;w;60			+	+
R.L.;w;44		+		
W.B.;w;61	+			+

Tabelle 7

RETROSPEKTIVE STUDIE: TUMOREN ANDERER ORGANE

Resistent in vitro/Resistent in vivo

Patient/ Geschlecht/ Alter	5-FU	MTX	ADM	EDX
B.H.;w;51	+		+	+
D.J.;w;76				+
D.W.;w;52				+
E.A.;m;47		+		
E.C.;w;68				+
E.R.;w;43			+	+
F.O.;m;66		+		+
G.M.;w;69				+
H.F.;m;26		+	+	+
J.J.;m;58			+	+
K.R.;m;43		+		+
K.R.;w;51	+			
M.M.;w;79	+			+
M.E.;m;32			+	
P.R.;w;31		+	+	+
R.A.;m;17		+		
R.A.;w;64			+	
R.J.;m;34	+	+	+	+
S.J.;m;17			+	+
W.B.;w;50	+			
W.E.;w;66	+			+
W.H.;w;56	+			+
W.M.;w;63	+		+	

Tabelle 8

RETROSPEKTIVE STUDIE: TUMOREN ANDERER ORGANE

Nicht resistent in vitro/Nicht resistent in vivo

Patient/ Geschlecht/ Alter	5-FU	MTX	ADM	EDX
B.J.;m;56			+	+
E.C.;w;68			+	
F.O.;m;66			+	
L.R.;w;36				+
P.M.;w;63	+			

Tabelle 9

5-Fluorouracil/retrospektiv

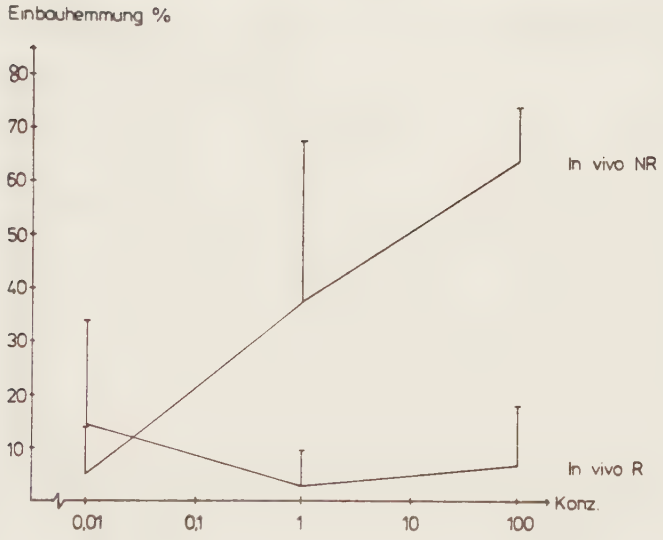

Abbildung 2

Methotrexat/retrospektiv

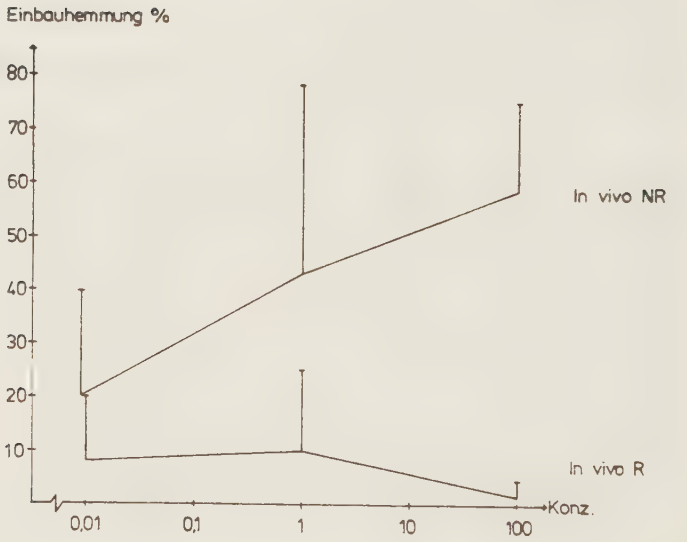

Abbildung 3

Adriamycin (Uridin)/retrospektiv

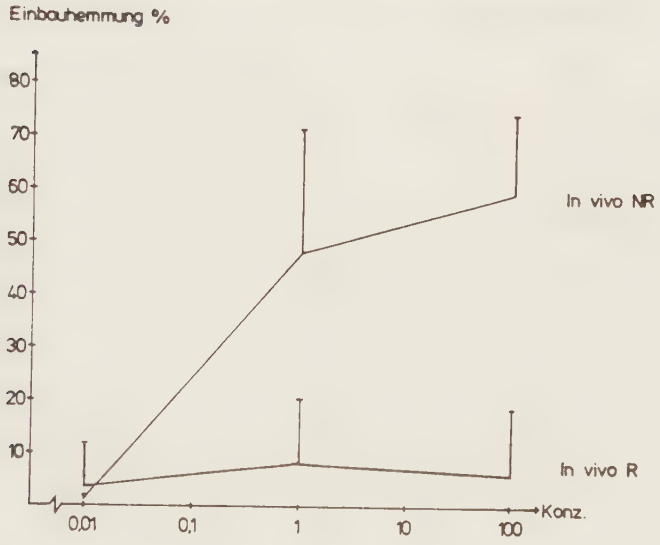

Abbildung 4

Adriamycin(Thymidin)/retrospektiv

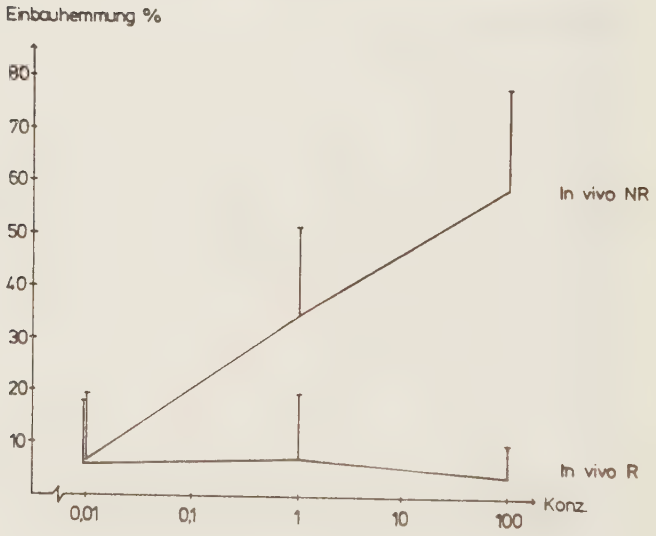

Abbildung 5

4-Hydroperoxycyclophosphamid(Uridin)/retrospektiv

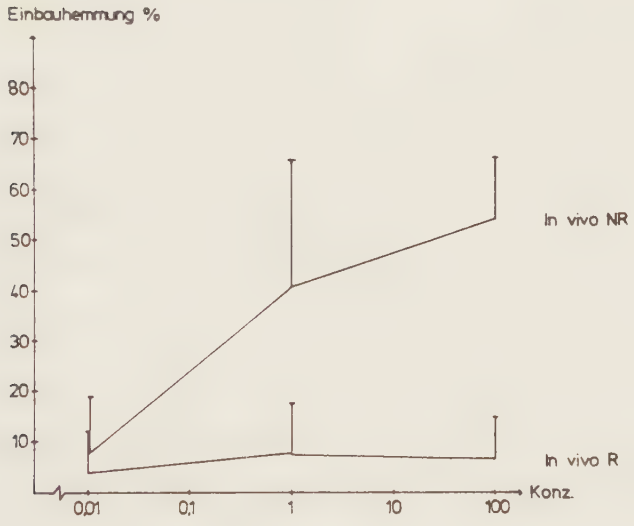

Abbildung 6

4-Hydroperoxycyclophosphamid (Thymidin)/retrospektiv

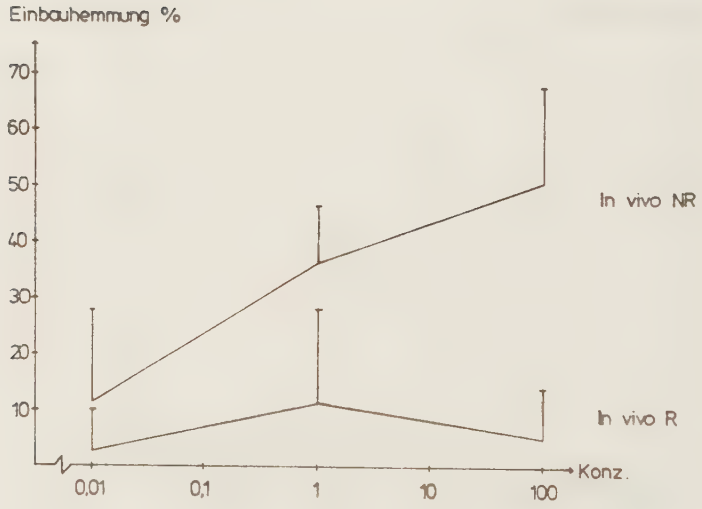

Abbildung 7

2.5 Diskussion

Für die Untersuchungen an menschlichen Malignomen wurden vier klinisch gebräuchliche Zytostatika, nämlich 5-Fluorouracil, Methotrexat, Adriamycin und anstelle des Cyclophosphamid ("Endoxan"^{R}) seine aktivierte Form, das 4-Hydroperoxycyclophosphamid verwendet, da Cyclophosphamid, ein in der Onkologie an zentraler Stelle stehendes Chemotherapeutikum, in vitro unwirksam ist. Seine Wirksamkeit in vivo wird erst durch die Aktivierung in der Leber möglich (29,30,32,71). Experimentelle Versuche, bei denen die Substanz zunächst durch den Zusatz von Leberextrakten, d.h. auf biologischem Weg aktiviert wurde, brachten im anschließenden In-vitro-Test bedingt durch die Fremdeiweißkontamination nur ungenaue Ergebnisse (30,71). BASTERT (1975) verwendete daher in vitro erstmals erfolgreich das 4-Hydroxycyclophosphamid sowie das stabilere 4-Hydroperoxycyclophosphamid, die nach den Untersuchungen von BROCK et al. die aktiven Metaboliten des Cyclophosphamid darstellen und zuerst von TAKAMIZAWA synthetisiert wurden (3).

5-Fluorouracil und Methotrexat hemmen als Antimetaboliten die DNS-Synthese (59). In früheren Untersuchungen war aufgefallen, daß in vitro der Einbau von 3H-Thymidin unter dem Einfluß dieser Substanzen stark anstieg. Dies erklärte sich aus der Aktivierung des salvagepathway mit Hilfe der Thymidinkinase, die durch eine End-

produkthemmung mit dem Syntheseweg über die Thymidylat-synthetase verknüpft ist. Da vorwiegend dieses Enzym durch die beiden Zytostatika gehemmt wird, ist die erhöhte Aufnahme von 3H-Thymidin verständlich (29,30,59,60). Als Stoffwechselmarker wurde daher, wie auch bei anderen Autoren, das 3H-Desoxyuridin für Methotrexat und das 3H-Uridin für 5-Fluorouracil verwendet (4,29,30,60,68,70). Problematisch ist dabei allerdings die Benutzung von 3H-Uridin im Falle des 5-Fluorouracils. Es kann nämlich durch die "Verdünnung" des angebotenen radioaktiven Uridins durch das Zytostatikum und seiner phosphorylierten Produkte zu einer Verfälschung des Testergebnisses kommen (59). Daher wurde das 3H-Uridin für weitere Untersuchungen, die in dieser Arbeit auf Grund der geringen Fallzahl noch keine Berücksichtigung fanden, durch das 3H-Desoxyuridin ergänzt.

Das onkolytische Antibiotikum Adriamycin und das Alkylans 4-Hydroperoxycyclophosphamid hemmen die DNS- und RNS-Synthese (59). Ihre Wirksamkeit bzw. Unwirksamkeit lassen sich, wie die Ergebnisse zeigen, durch die Messung des 3H-Thymidin- bzw. 3H-Uridin-Einbaus gleichermaßen gut darstellen.

Durch die Verwendung von Mikrotiterplatten und des Multiprezipitator-Harvester ist es möglich, pro untersuchter Antitumorsubstanz 48 Einzelansätze auszuwerten, wodurch eine bessere statistische Absicherung der Ergebnisse gewährleistet ist.

Der Test erfaßt methodisch bedingt nur die So-

fortwirkung eines Zytostatikums auf die Tumorzellen. Da jedoch noch ein bis zwei Zellteilungen stattfinden können, bis sich ein medikamenteninduzierter Schaden manifestiert hat und die Zellen zugrunde gehen, sind Voraussagen über das weitere Schicksal der Zellen im Kurzzeittest nicht möglich.

Außerachtgelassen werden weiterhin "repair-Vorgänge", d.h. Mechanismen, die die durch Zytostatika hervorgerufenen Schäden an den Nukleinsäuren wieder ausgleichen. Diese Vorgänge können während der dreistündigen Inkubation durchaus so effektiv sein, daß eine Verfälschung des Testergebnisses resultiert (59).

Die Vorhersage einer Zytostatikasensibilität eines Tumors in vivo ist daher auch aus diesen, neben den schon dargestellten Gründen kritisch zu beurteilen.

Gegenüber dem Sensibilitätstest schafft der Resistenztest daher bewußt eine Idealsituation, wie sie in vivo niemals auftritt: Das Zytostatikum kann in einer 100-fachen therapeutischen Konzentration unmittelbar auf die Tumorzellen einwirken. Kommt es auch unter diesen Bedingungen zu keiner Hemmung des Nukleinsäurestoffwechsels, so ist höchst unwahrscheinlich, daß das betreffende Medikament in vivo gegen den Tumor wirksam ist.

Die Aussagekraft des Resistenztestes hob eine Untersuchung von BECH-HANSEN und Mitarbeitern (1977) hervor. Es gelang ihnen, eine Resistenz gegenüber Adriamycin, Daunomycin und Methotrexat bereits dann nachzuweisen, wenn der Anteil der resistenten Tumorzellen in einer sonst sensiblen

Population weniger als 10 % betrug (6).

Da bis zu 75 % aller Therapieversager in der Krebschemotherapie durch primäre Resistenzphänomene bedingt sind (37), ist es offensichtlich, welch große Bedeutung ein Test hat, der vor Einleitung einer zytostatischen Therapie die unwirksamen Medikamente herausfindet. Darüber hinaus ist der Test in der Lage, sekundär entstandene Resistenzen zu erfassen (45,74,76).

Die Aussagekraft des Resistenztest wird eingeschränkt im Falle von sehr langsam proliferierenden Tumoren mit nur einer geringen Wachstumsfraktion; diese nehmen während der dreistündigen Inkubationsdauer nur sehr wenig radioaktiv markierte Stoffwechselpräkursoren auf, so daß eine Resistenz vorgetäuscht werden kann. Für solche Tumoren kann eine In-vitro-Wirksamkeit nur in der Langzeitkultur erfaßt werden (59).

Schließlich ist noch zu erwähnen, daß in diesem Test ausschließlich die Wirksamkeit der Substanzen auf die DNS- und RNS-Synthese untersucht werden kann. Vincaalkaloide, die durch eine Mitosearretierung das Zellwachstum beinflussen oder Bleomycin, das den DNS-Reparaturmechanismus hemmt und insbesondere nicht proliferierende G_0-Phase-Zellen schädigt, sind in diesem Testsystem nicht verwendbar (59,71,77). Deren Wirkeffekte sind nur in der Zellkultur feststellbar.

3. Sicherung des Resistenztestes in einer prospektiven Studie

3.1. Einleitung

Unter Berücksichtigung der genannten Einschränkungen stellt der Resistenztest eine gute Hilfe bei der Auswahl von Zytostatika für eine geplante Therapie dar, denn er ermöglicht die grundsätzliche Aussage, ob das untersuchte Tumormaterial gegenüber den verwendeten oder für eine Verwendung vorgesehenen Medikamenten resistent oder nicht resistent ist.

Deshalb wurde der Resistenztest für eine prospektive Studie herangezogen, d.h. eine Chemotherapie entsprechend klinisch bewährter Behandlungsschemata wurde erst nach Durchführung des Tests eingeleitet.

3.2. Material

Technisches Material: siehe unter 2.2.

Tumormaterial:

In der Studie wurden überwiegend Zellen aus malignen Höhlenergüssen getestet. Eine Übersicht über die Herkunft dieser Ergüsse und des soliden Tumormaterials gibt die Tabelle 10.

3.3 Methodik

Technische Durchführung siehe unter 2.3.

Bei der Auswertung des Tests wurde nunmehr so verfahren, daß ein Tumor dann als resistent bzw. nicht resistent eingestuft wurde, wenn die Einbauhemmung unter der höchsten eingesetzten Konzentration nicht über den Bereich der zweifachen Standardabweichung der für jede Substanz erstellten Dosis-Wirkungs-Kurven hinausging.

PROSPEKTIVE ANALYSE DER IN VITRO TESTERGEBNISSE UND DES KLINISCHEN VERLAUFS UNTER CHEMOTHERAPIE

TUMOR :	Mamma - CA :	n = 15
	Ovarial - CA :	n = 8
	Tumoren anderer Organe :	n = 3
METASTASEN :	Weichteil :	n = 6
	Lymphknoten :	n = 4
	Haut :	n = 4
	Knochen :	n = 8
	Lunge :	n = 5
	Leber :	n = 5
ALTER :	m = 54 (Range : 32 - 76)	
GESCHLECHT :	männlich : n = 1	
	weiblich : n = 25	
VORBEHANDLUNG :	hormonell und zytostatisch :	n = 7
	zytostatisch :	n = 16

Tabelle 10

3.4. Ergebnisse

Einen Überblick über die Testergebnisse gibt die Abbildung 8.

Bei den Untersuchungen an 15 metastasierenden Mammakarzinomen wurde in 8 Fällen vom In-vitro-Test eine Resistenz vorausgesagt, die sich auch klinisch bestätigte. In 4 Fällen fand sich weder in vitro noch in vivo ein Hinweis für eine Zytostatikaresistenz; weitere 3 Fälle waren zwar in vitro sensibel, zeigten aber ein resistentes Verhalten gegenüber der zytostatischen Therapie. Bei 8 Patientinnen mit metastasierendem Ovarialkarzinom zeigte sich in 3 Fällen eine Resistenz sowohl in vitro als auch in vivo. In 4 Fällen korrelierte die fehlende Resistenz gegenüber den klinisch eingesetzten Zytostatika mit dem In-vitro-Ergebnis. In einem Fall konnte im In-vitro-Test kein Anzeichen einer Resistenz gefunden werden, während sich der Tumor klinisch resistent verhielt. Von 3 untersuchten metastasierenden Tumoren anderer Organe erwiesen sich zwei Fälle in vitro und in vivo als resistent; in einem Fall bestätigte sich die fehlende Resistenz in vitro durch das klinische Verhalten. Wiederum erwies sich in keinem der insgesamt 26 untersuchten Fälle ein Tumor, der in vitro als resistent eingestuft wurde, in vivo als sensibel. Die richtig positive Vorhersagerate einer Resistenz lag somit wie bei der retrospektiven Studie bei 100 %, während die richtig positive Vorhersagerate einer Sensibilität sich auf 69 % erhöhte.

PROSPEKTIVE ANALYSE DER IN VITRO TESTERGEBNISSE UND DES KLINISCHEN VERLAUFS UNTER CHEMOTHERAPIE

TUMOR	ANZAHL DER PATIENTEN	TUMOR I R/R	TUMOR II R/S	TUMOR III S/S	TUMOR IV S/R
MAMMA	15	8	0	4	3
OVAR	8	3	0	4	1
ANDERE	3	2	0	1	0
TOTAL	26	13	0	9	4

RICHTIG POSITIV: (S/S) / (S/S + S/R) x 100 = 69 %
RICHTIG NEGATIV: (R/R) / (R/R + R/S) x 100 = 100 %

I = TUMOR RES. IN VIVO UND IN VITRO
II = TUMOR RES. IN VITRO UND SENS. IN VIVO
III = TUMOR SENS. IN VIVO UND IN VITRO
IV = TUMOR SENS. IN VITRO UND RES. IN VIVO

Abbildung 8

3.5. Diskussion

Die überwiegende Verwendung von Zellen aus malignen Höhlenergüssen in der Studie ist in zweifacher Hinsicht vorteilhaft. Zum einen ist ihre Gewinnung relativ einfach, zum anderen sind die Zellverluste bei der Herstellung einer Einzelzellsuspension im Gegensatz zu soliden Tumoren, bei denen eine mechanische Aufbereitung nötig ist, durch den einmaligen Zentrifugationsschritt sehr gering.

Die in der Studie erzielten Ergebnisse sind mit den Angaben anderer Untersucher vergleichbar. So liegt die richtig positive Vorhersagerate einer Sensibilität bei den einzelnen Autoren zwischen 62 % und 80 % (1,25,26,55, 75). Teilweise wurden noch bessere Ergebnisse erreicht, die aber nur an sehr kleinen Patientenzahlen gewonnen wurden (34,51).

Deutlich höher liegt dagegen die richtig positive Vorhersagerate einer Resistenz. Es wurden Werte zwischen 91 % und, wie mit diesem Test, 100 % erreicht (1,26,51,58,72).

Die offensichtliche Verbindlichkeit der Aussage "resistent" veranlaßte bereits einige Autoren, bei der Behandlung eines Tumorkranken erst alle anderen klinischen Möglichkeiten auszuschöpfen, bevor als ultima ratio doch noch eine Chemotherapie eingeleitet wurde (58).

Die bereits oben dargestellte Problematik eines Sensibilitätstests sowie die eindeutig besseren und zuver-

lässigeren Ergebnisse des Resistenztests sollten daher dazu veranlassen, dem Begriff der "Resistenztestung" endgültig den Vorrang gegenüber dem Begriff der "Sensibilitätstestung" zu geben (73).

4. Konsekutive Stoffwechseluntersuchungen vor und nach Chemotherapie

4.1. Einleitung

Wie aus den bisherigen Ausführungen hervorgeht, kann mit keinem der angeführten Untersuchungsverfahren mit letzter Sicherheit die Wirksamkeit einer geplanten Chemotherapie vorausgesagt werden, sondern es können als Resistenztestaussage nur die unwirksamen Substanzen aufgedeckt werden.

Da es aber wenigstens drei Wochen und meist viel länger dauert, bis der Erfolg oder Mißerfolg einer zytostatischen Therapie mit klinischen Mitteln festgestellt werden kann, wären Untersuchungsverfahren, die unmittelbar nach Einleitung der Therapie eine Voraussage ermöglichten, von großem Wert (17).

In der Literatur ist hierfür überwiegend die Methode der Autoradiographie, d.h. Bestimmungen des LI vor und nach Chemotherapie beschrieben.

MCDONALD und Mitarbeiter (1966) untersuchten zwei Gruppen von Zytostatika, von denen die eine in vivo bekanntermaßen wirksam, die andere unwirksam gegen das verwendete Ehrlich-Aszites-Karzinom der Maus war. In einem Zeitraum von bis zu 96 Stunden nach Applikation der Substanzen fand sich

in der Gruppe der wirksamen Medikamente ein signifikanter Abfall des LI gegenüber den Kontrollen, während dies in der Gruppe der unwirksamen Substanzen nicht zutraf (39).

SKY-PECK (1971) bestimmte in einer retrospektiven Studie den LI in menschlichen Tumorbiopsien vor und 7 Tage nach Therapiebeginn. Eine Änderung des LI korrelierte in 87 % der Fälle mit dem klinischen Verlauf (61).

MURPHY (1975) und THIRLWELL (1976) erzielten ähnliche Ergebnisse. Sie zogen eine Änderung des LI um den Faktor 1,9 als Maß für die Wirksamkeit bzw. Unwirksamkeit einer durchgeführten Therapie heran. Interessanterweise verwendete THIRLWELL für seine Untersuchungen als Inkubationsmedium das Eigenserum der Patienten, denen kurz vor der Biopsie die Zytostatika intravenös appliziert worden waren; dies geschah, um physiologische Verhältnisse in einem In-vitro-Test nachzuahmen (41,63).

Mit Hilfe der Szintillationstechnik bestimmten ZITTOUN und Mitarbeiter (1975) bei Leukämiepatienten die Thymidineinbaurate in Knochenmarksbiopsien vor und 48 Stunden nach Medikamentenapplikation. In 15 von 19 Fällen mit einer Remission kam es dabei zu einem signifikanten Abfall der Thymidineinbaurate (86).

POSSINGER und Mitarbeiter (1980) untersuchten am Walker-Aszites-Karzinosarkom der Ratte die 3H-Thymidinaufnahme durch die Tumorzellen vor sowie drei, sechs und 24 Stunden nach Zytostatikagabe. Es zeigte sich bei den behandelten Tieren gegenüber den Kontrollen eine

signifikante Verminderung der 3H-Thymidinaufnahme, die mit dem objektiven klinischen Zeichen einer signifikant verlängerten Überlebenszeit verbunden war (47,48).

Gerade diese letzten Ergebnisse bildeten die Grundlage für die Untersuchungen an menschlichen Malignomen. Sie sollen nun im folgenden beschrieben werden.

4.2. Material

Technisches Material: siehe unter 2.2.

Tumormaterial: Es wurden ausschließlich Zellen aus malignen Höhlenergüssen (Pleuraerguß, Aszites) verwendet. Eine Übersicht über die Herkunft dieser Ergüsse gibt die Tabelle 11.

4.3. Methodik

Die Punktion der malignen Ergüsse erfolgte jeweils unmittelbar vor und 24 Stunden nach Zytostatikaapplikation.

Die Punktate wurden 10 Minuten mit 200 g zentrifugiert und anschließend der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in vorgewärmter Nährlösung resuspendiert und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer auf eine Zellzahl von 200000/ml Nährlösung eingestellt. In 12 Einzelansätzen auf der Mikrotiterplatte wurden nunmehr 100 µl Nährlösung jeweils 50 µl eingestellte Zellsuspension sowie 20 µl 3H-Thymidin zugesetzt. In einigen Fällen erfolgten zusätzlich 12 Ansätze mit 3H-Uridin als Stoffwechselpräkursor. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 37 ^{0} C wurden die Ansätze wie unter 2.3. beschrieben auf Filterstreifen gesogen und der Einbau der Stoffwechselmarker im Szintillationsmeßgerät bestimmt.

Eine Verminderung des Einbaus nach Zytostatikagabe wurde in %, bezogen auf den Ausgangswert errechnet.

Wie unter 2.3. beschrieben, wurden zum raschen Tumorzellnachweis mit Hilfe der Zytozentrifuge Präparate und zur Sicherung des Stoffwechselpräkursoreneinbaus durch die Tumorzellen Autoradiographien angefertigt.

Die klinische Wirksamkeit der durchgeführten Chemotherapie wurde nach drei Monaten mit den üblichen Methoden einschließlich der Computertomographie überprüft.

KONSEKUTIVE STOFFWECHSELUNTERSUCHUNGEN VON

MENSCHLICHEN TUMORZELLEN VOR UND 24h NACH ZYTOSTATIKAINJEKTION

TUMOR:	Mamma - CA:	n = 9
	Ovarial - CA:	n = 7
	Tumoren anderer Organe:	n = 2
METASTASEN:	Weichteil:	n = 3
	Lymphknoten:	n = 3
	Haut:	n = 3
	Knochen:	n = 4
	Lunge:	n = 1
	Leber:	n = 2

ALTER: $\bar{x}$ = 56 (Range: 32 - 76)

GESCHLECHT: männlich: n = 1
weiblich: n = 17

VORBEHANDLUNG: hormonell und zytostatisch: n = 6
zytostatisch: n = 8

Tabelle 11

4.4. Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen die Abbildungen 9 - 11. Die Hemmung der 3H-Thymidineinbaurate liegt bei den Tumoren, die sich in vivo als progredient erwiesen, im Mittel bei 3,5 %. Dagegen ist die Hemmung bei den Tumoren, die in vivo eine Remission oder ein stationäres Verhalten zeigten, mit 45 % deutlich höher.

Für eine statistische Prüfung dieser Ergebnisse im Vierfeldertest wurde für den Fall der Progredienz eine maximale Einbauhemmung von 29 % gesetzt. Dieser Wert entspricht demjenigen, der für den Fall der Resistenz unter der höchsten im Resistenztest eingesetzten Konzentration im Bereich der zweifachen Standardabweichung maximal erreicht wurde (siehe 2.4).

Vierfeldertafel

3H-Thymidin Einbauhemmung	Progredienz	Remission oder stationäres Verhalten	
< 29 %	10	1	11
> 29 %	0	7	7
	10	8	18

Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe des exakten Fischer-Tests (Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage 1968, Seite 109).

Das Testergebnis zeigt einen hochsignifikanten Unterschied der 3H-Thymidineinbauhemmung zwischen progredienten und nicht progredienten Tumoren ($p \leq 0{,}002$).

Kein signifikanter Unterschied ergab sich bei der Hemmung der 3H-Uridininkorporation, was aber eventuell durch eine zu geringe Fallzahl bedingt ist.

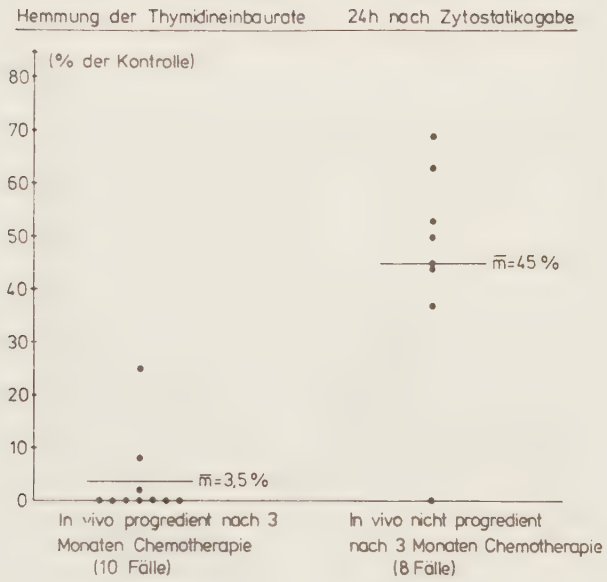
Hemmung der Thymidineinbaurate 24h nach Zytostatikagabe
(% der Kontrolle)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
m̄=45 %
m̄=3,5 %
In vivo progredient nach 3 Monaten Chemotherapie (10 Fälle)
In vivo nicht progredient nach 3 Monaten Chemotherapie (8 Fälle)

Abbildung 9

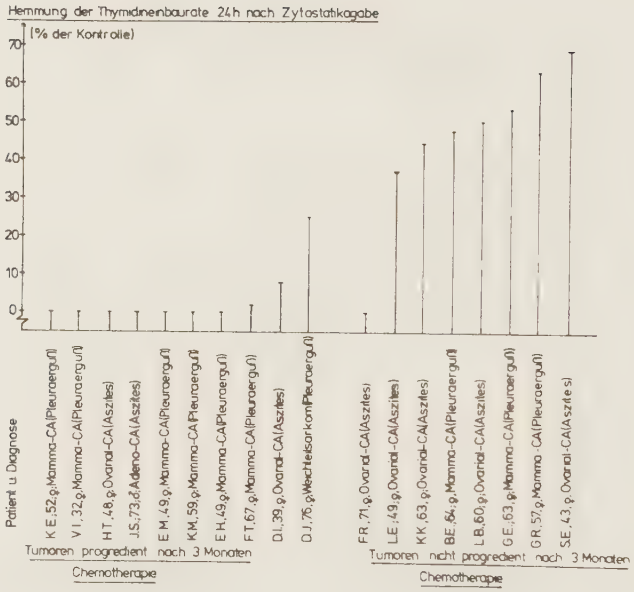

Abbildung 10

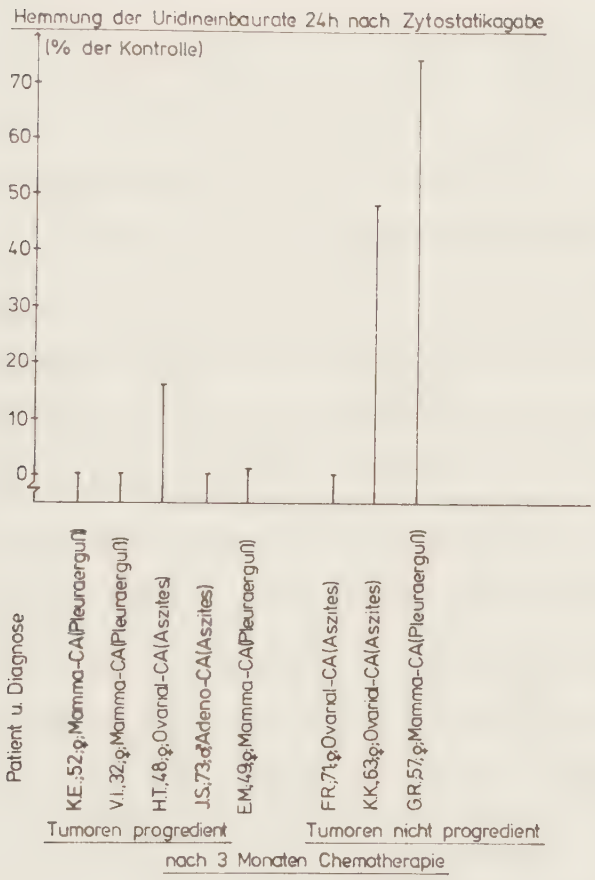

Abbildung 11

4.5 Diskussion

Für die Untersuchungen wurden ausschließlich Zellen aus malignen Höhlenergüssen verwendet, da diese bestimmte Vorteile besitzen.

1. Die Gewinnung eines Ergußes durch Punktion ist zu Kontrolluntersuchungen leicht wiederholbar und stellt für den Patienten einen relativ erträglichen Eingriff dar. Dagegen ist die Durchführung einer Biopsie besonders eines schwer zugänglichen Tumors eine große Belastung für den Patienten. Die Vorstellungen MURPHYS, daß der Wert der von ihm durchgeführten Untersuchungen ein aggressiveres Vorgehen bei der Biopsie (z.B. durch wiederholte Bronchoskopie) rechtfertige (41), müssen daher kritisch beurteilt werden.

2. Die Tumorzellen liegen im Erguß bereits als Einzelzellsuspension vor; demgegenüber können bei der Herstellung einer Tumorzellsuspension aus solidem Tumormaterial durch die mechanische Aufbereitung starke Läsionen gesetzt werden.

3. Der Anteil proliferativer Zellen im Erguß ist relativ konstant (47,48), während bei soliden Tumoren die Möglichkeit besteht, daß bei konsekutiven Biopsien Proben mit einem unterschiedlichen Anteil proliferativer Zellen gewonnen werden.

Daß die beiden letztgenannten Punkte für die Aussagekraft solcher Untersuchungen von entscheidender Bedeutung

sind, wurde bereits ausführlich dargestellt.

Als der Methode innewohnender Nachteil muß bei den autoradiographischen Verfahren erwähnt werden, daß ihre Anfertigung sehr zeitaufwendig ist. Die Versuchsdauer beträgt zwischen 3 Tagen und 3 Wochen (41,61,63). Demgegenüber sind die Ergebnisse des dargestellten Tests innerhalb eines Tages verfügbar.

Dazu kommt, daß die Auswertung einer Autoradiographie durch das Auszählen von bis zu 1000 Zellen unter dem Mikroskop sehr mühsam ist und die Differenzierung von Makrophagen, Mesothel-, Plasma- und Tumorzellen beträchtliche Probleme aufwerfen kann (41).

Abschließend ist zu sagen, daß die Kombination von Resistenztest und konsekutiven Stoffwechseluntersuchungen, d.h. die Aufdeckung von a priori unwirksamen Substanzen und die Überprüfung der Wirksamkeit der applizierten Medikamente, eine Möglichkeit darstellt, einen weiteren Schritt hin auf dem Weg zu einer möglichst individuellen Chemotherapie zu tun.

Zusammenfassung

Die medikamentöse Behandlung maligner Geschwülste erfolgt heute weitgehend nach empirisch gewonnenen Therapieschemata. Da viele Tumoren sich jedoch trotz gleicher Histologie und Lokalisation in ihrem Verhalten gegenüber den eingesetzten zytostatischen Substanzen unterscheiden, ist es notwendig, bereits vor Therapiebeginn die wirksamen Medikamente mit Hilfe eines In-vitro-Tests herauszufinden. Anfangs wurden dazu Gewebekulturen verwendet, bei denen die Wirksamkeit der Antitumorsubstanzen nach morphologischen oder biochemischen Gesichtspunkten beurteilt wurde. Da diese Untersuchungen sehr zeitaufwendig sind, wurden in zunehmendem Maß Kurzzeitteste durchgeführt, die die antiproliferative Aktivität der Substanzen durch die Messung veränderter Einbauraten von radioaktiv markierten Zellstoffwechselpräkursoren feststellten. Mit nahezu allen Testen wurde versucht, Aussagen über die Sensibilität eines Tumors zu treffen, die jedoch vor allem auf Grund unphysiologischer Testbedingungen unsicher und ungenau waren.

In dieser Arbeit wurde ein Resistenztest untersucht, bei dem Änderungen der Inkorporation von 3H-Thymidin, 3H-Desoxyuridin und 3H-Uridin unter dem Einfluß der 0,01-, 1- und 100-fachen therapeutischen Dosis der verwendeten Medikamente gemessen werden. In einer Pilotstudie an 10 klinisch

eindeutig therapieresistenten Tumoren war als Kriterium für eine In-vitro-Resistenz eine Einbauverminderung von maximal 28 % gegenüber den Kontrollen unter der höchsten eingesetzten Konzentration herausgearbeitet worden. In einer retrospektiven Studie wurden 106 Tumoren untersucht. In 75 Fällen fand sich in vitro eine Resistenz, die sich auch klinisch bestätigte. In vitro und in vivo nicht resistent waren 29 Fälle. In 24 Fällen wurde ein Tumor als sensibel eingestuft, obwohl er sich in vivo resistent verhielt. In keinem Fall erwies sich ein Tumor, der als resistent eingestuft worden war in vivo als sensibel. Die richtig positive Vorhersagerate einer Resistenz lag also bei 100 %, die einer Sensibilität bei 55 %. Aus diesen Ergebnissen wurden für vier in der klinischen Onkologie oft verwendete Substanzen, nämlich Cyclophosphamid, Adriamycin, Methotrexat und 5-Fluorouracil genaue Dosis-Wirkungskurven erstellt, um eindeutigere Kriterien für eine Resistenz bzw. Nichtresistenz zu gewinnen.

Diese Kriterien wurden in einer prospektiven Studie an 26 Tumoren überprüft. Eine Übereinstimmung der Resistenz in vitro und in vivo fand sich in 13 Fällen; nicht resistent in vitro und in vivo waren 9 Fälle. Viermal wurde ein Tumor in vitro als sensibel eingestuft, obwohl er sich in vivo als resistent erwies. In keinem Fall war ein Tumor, der in vitro als resistent bezeichnet wurde, in vivo sensibel. Somit lag die richtig positive Vorhersagerate einer Resistenz wiederum bei 100 %, die einer Sensibilität bei 69 %.

Um die Wirksamkeit einer durchgeführten Chemotherapie frühzeitig zu erfassen, wurde in einer Studie an 18 Patienten die 3H-Thymidin-, in einigen Fällen auch die 3H-Uridin-Einbaurate in Tumorzellen aus malignen Höhlenergüssen vor und 24 Stunden nach Zytostatikaapplikation gemessen. Eine Tumorprogression nach drei Monaten Chemotherapie korrelierte in allen von 10 Fällen mit einer Thymidineinbauminderung kleiner als 29 %; in 7 von 8 Fällen, bei denen das Tumorwachstum keine Progredienz zeigte, war die Einbauverminderung größer als 29 %. Dieser Unterschied ist hochsignifikant ($p \leq 0{,}002$); kein signifikanter Unterschied fand sich für das 3H-Uridin.

Literaturverzeichnis

1. Alberts, D.S., Salmon, S.E., Chen, H.S.G., Surwit, E.A., Soehnlen, B., Young, L., Moon, T.E.:In-Vitro Clonogenic Assay for Prediciting Response Of Ovarian Cancer to Chemotherapy. Lancet 2,340-342 (1980)
2. Ballon, S.C.: Ovarian Carcinoma:In Vitro Testing of Sensitivity to Chemotherapy. West.J.Med. 134, 529 (1981)
3. Bastert,G. und Schmidt-Matthiesen, H.: In vitro Sensibilitätstestung von Tumoren gegenüber aktiviertem Cyclophosphamid (4-Hydroxycyclophosphamid). Z. Krebsforsch. 84, 37-47 (1975)
4. Bastert, G., Schmidt-Matthiesen, H., Gerner, R., Michel, R.T., Nord, D. und Leppien, G.: In-vitro-Testung der Sensibilität von Mammakarzinomen gegen Zytostatika. Dtsch.med. Wschr. 100, 2035-2042 (1975)
5. Bateman, A.E., Peckham, M.H. and Steel, G.G.: Assays of Drug Sensitivity for Cells from Human Tumours: In Vitro and in Vivo Tests on a Xenografted Tumour. Br.J.Cancer 40, 81 (1979)
6. Bech-Hansen, N.T., Sarangi, F., Sutherland, D.J.A. and Ling, V.: Rapid Assays for Evaluating the Drug Sensitivity of Tumor Cells. J. Natl. Cancer Inst. 59, 21-27 (1977)
7. Berenbaum, M.C.: Predicting Response of Human Cancer to Chemotherapy. Lancet 2, 1141-1142 (1974)

8. Berry, R.J., Laing, A.H. and Wells, J.: Fresh Explant Culture of Human Tumours in Vitro and the Assessment of Sensitivity to Cytotoxic Chemotherapy. Br. J. Cancer 31, 218 (1975)

9. Bickis, I.J., Henderson, W.D. and Quastel, J.H.: Biochemical Studies of Human Tumors II. In Vitro Estimation of Individual Tumor Sensitivity to Anticancer Agents. Cancer 19, 103-113 (1966)

10. Cobb, J.P., Walker, D.G. and Wright, J. C.: Comparative Chemotherapy Studies on Primary Short-Term Cultures of Human Normal, Benign, and Malignant Tumor Tissues - a Five- Year Study. Cancer Research 21, 583 (1961)

11. Courtenay, LV. D., Selby, P.J., Smith, I.E., Mills, J. and Peckham, M.J.: Growth of Human Tumour Cell Colonies from Biopsies Using Two Soft-Agar Techniques. Br. J. Cancer 38, 77 (1978)

12. Di Paolo, J. A.: In Vitro Test Systems for Cancer Chemotherapy. I. Inhibition of Dehydrogenases and Growth in the Ehrlich Ascites Tumor. Cancer, Research 23, 184 (1963)

13. Di Paolo, J.A.: Analysis of an Individual Chemotherapy Assay System. Nat. Cancer Inst. Monogr. 34, 240-245 (1972)

14. Eagle, H. and Foley, G.E.: The Cytotoxic Action of Carcinolytic Agents in Tissue Culture. Am. J. Med. 21, 739 (1956)

15. Editorial: Testing Anti-Cancer Drugs. Lancet 1,827-828

(1972)

16. Friedkin, M., Tilson, D. and Roberts, D.: Studies of Deoxyribonucleic Acid Biosynthesis in Embryonic Tissues with Thymidine - 14C. J. Biol. Chem. 220, 627-637 (1956)
17. Hall, T.C.: Predictive Tests in Cancer. Br. J. Cancer 30, 191 (1974)
18. Hamburger, A.W. and Salmon, S.E.: Primary Bioassay of Human Tumor Stem Cells. Science 197, 461-463 (1977)
19. Hamburger, A.W., Salmon, S.E., Kim, M.B., Trent, J.M., Soehnlen, B. J., Alberts, D.S. and Schmidt, H.J.: Direct Cloning of Human Ovarian Carcinoma Cells in Agar. Cancer Research 38, 3438 - 3444 (1978)
20. Hart, J.S., Shirakawa, S., Trujillo, J. and Frei, E.: The Mechanism of Induction of Complete Remission in Acute Myeloblastic Leukemia in Man. Cancer Research 29, 2300-2307 (1969)
21. Heckmann, U.: Neue Möglichkeiten einer Resistenzprüfung menschlicher Karzinomgewebe gegen Zytostatika im In-vivo-Test. Dtsch.med.Wschr. 92, 932-935 (1967)
22. Heppner, G.H., Dexter, D.L., De Nucci, T., Miller, F.R. and Calabresi, P.: Heterogeneity in Drug Sensitivity among Tumor Cell Subpopulations of a Single Mammary Tumor. Cancer Research 38, 3758-3763 (1978)
23. Hirschberg, E.: Tissue Culture in Cancer Chemotherapy Screening. Cancer Research 18, 869-878 (1958)

24. Holmes, H.L. and Little, J.M.: Tissue-Culture Microtest for Predicting Response of Human Cancer to Chemotherapy. Lancet 2, 985-987 (1974)

25. Kondo, T.: Prediction of Response of Tumor and Host to Cancer Chemotherapy. Nat. Cancer Inst. Monogr. 34, 251-256 (1972)

26. Kooperative Studie für Sensibilitätstestung von Tumoren (KSST): Sensibilitätstestung menschlicher Tumoren gegenüber Zytostatika mit einem In-vitro-Kurzzeittest. Dtsch. med. Wschr. 105, 1493-1496 (1980)

27. Knock, F.E.: Sensitivity Tests for Cancer Chemotherapy. Arch. Surg. 91, 376-385 (1965)

28. Knock, F. E., Galt, R.M., Oester, Y.T. and Sylvester, R.: In vitro Estimate of Sensitivity of Individual Human Tumors to Antitumor Agents. Oncology 30, 1-22 (1974)

29. Kummer, D.: Cytostatica- und Röntgenstrahleneffekte im Nucleinsäurestoffwechsel von soliden, malignen Tumoren in vitro. Z. Krebsforsch. 74,76-90 (1970)

30. Kummer, D.: Cytostatica-Sensibilitätstest solider, maligner Tumoren in vitro zur gezielten kombinierten operativen und chemotherapeutischen Behandlung des Krebsleidens. Z. Krebsforsch. 76, 124-139 (1971)

31. Kummer, D. und Mildenberger, H.: Die Bedeutung des sogenannten Onkobiogramms für die Therapie maligner Tumoren des Kindes. Mschr. Kinderheilk. 123, 390-391 (1975)

32. Limburg, H. und Krahe, M.: Die Züchtung von menschlichem

Krebsgewebe in der Gewebekultur und seine Sensibilitätstestung gegen neuere Zytostatika. Dtsch. med. Wschr. 89, 1938-1946 (1964)

33. Livingston, R.B., Ambus, U., George, S.L., Freireich, E.J. and Hart, J.S.: In Vitro Determination of Thymidine - 3H Labeling Index in Human Solid Tumors. Cancer Research 34, 1376-1380 (1974)
34. Livingston, R.B., Titus, G.A. and Heilbrun, L.K.: In Vitro Effects on DNA Synthesis as a Predictor of Biological Effect from Chemotherapy. Cancer Research 40, 2209-2212 (1980)
35. Mattern, J., Kaufmann, M., Hinderer, H., Wayss, K. and Volm, M.: Sensitivity Tests of Tumors to Cytostatic Agents. II. Investigation on Human Tumors. Z. Krebsforsch. 83, 97-104 (1975)
36. Matthias, M.: Methoden und Anwendungsmöglichkeiten der Organkultur in der Klinischen und experimentellen Krebsforschung. Arch. Geschulstforsch. 41/4, 382-397 (1973)
37. Matthias, M., Matthes, Th., Tanneberger, St.: Chemotherapeutische Studien unter Berücksichtigung des Onkobiogramms. Z. Erkr. Atm. 142, 132-139 (1975)
38. McAllister, R.M., Grunmeier, P.W., Coriell, L.L. and Blakemore, W.S.: A Quantitative Technique for the Measurement of in Vitro Cytotoxicity of 5-Fluoro-2-Deoxyuridine, Nitrogen Mustard and Other Antitumor Agents.Cancer 12, 938-943 (1959)

39. McDonald, G.O., McIver, J.M., LLamas, A.J. and Sky-Peck, H.H.: Tumor Cytotoxicity. Arch. Surg. 92, 541-547 (1966)

40. Mitchell, J.S., Dendy, P.P., Dawson, M.P.A. and Wheeler, T.K.: Testing Anti-Cancer Drugs. Lancet, i. 955 (1972)

41. Murphy, W.K., Livingston, R.B., Ruiz, V.G., Gercovich, F.G., George, S.L., Hart, J.S. and Freireich, E.J.: Serial Labeling Index Determination as a Predictor of Response in Human Solid Tumors. Cancer Research 35, 1438-1444 (1975)

42. Ogawa, M., Bergsagel, D.E. and McCulloch, E. A.: Chemotherapy of Mouse Myeloma: Quantitative Cell Cultures Predictive of Response In Vivo. Blood 41, 7-15 (1973)

43. Ogawa, M., Bergsagel, D.E. and McCulloch, E.A.: Sensitivity of Human and Murine Hemopoietic Precursor Cells to Chemotherapeutic Agents Assessed in Cell Culture. Blood 42, 851-856 (1973)

44. Possinger, K., Hartenstein, R. und Ehrhart, H.: Resistenztestung von menschlichen Tumoren gegenüber Cytostatika. Klin.Wschr. 54, 349-355 (1976)

45. Possinger, K., Hartenstein, R. und Ehrhart, H.: Resistenztestung maligner Tumoren. Möglichkeit zur Analyse klinischer Sekundär-Resistenzentwicklung gegenüber Zytostatika. Münch. med. Wschr. 120, 725-728 (1978)

46. Possinger, K., Hartenstein, R. und Ehrhart, H.: In-vitro-Resistenztestung von Tumoren gegenüber

Zytostatika. 2. Untersuchungen an menschlichen Malignomen. Onkologie 6, 297-300 (1980)

47. Possinger, K., Hartenstein, R. and Ehrhart, H.: The Incorporation Rate of Tritiated Precursors of DNA- and RNA-Synthesis in human Tumor Cells - an Index of Specific Efficacy of Cytotoxic Agents? E.O.R.T.C. Symposium, Madrid, abstract, 17 (1980)

48. Possinger, K., Hartenstein, R., Misera, C. und Ehrhart, H.: Hemmung der 3H-TdR-Aufnahme in Tumorzellen nach Zytostatikagabe als Maß therapeutischer Wirksamkeit. Blut 43, 105-107 (1981)

49. Rajewski, M.F.: Thymidin-Inkorporation und O_2-Konzentration in Explantaten normaler und maligner Gewebe "in vitro". Naturwissenschaften 52, 341 (1965)

50. Richmond, H.G. and Billington, R.W.: Chemotherapy sensitivity testing in human tumours. J. Clin. Pathol. 34, 343-350 (1981)

51. Salmon. S.E., Hamburger, A.W., Soehnlen, B., Durie, B.G.M., Alberts, D.S. and Moon, T.E.: Quantitation of Differential Sensitivity of Human-Tumor Stem Cells to Anticancer Drugs. N. Engl. J.Med. 298, 1321-1327 (1978)

52. Salmon, S.E. and Buick, R.N.: Preparation of Permanent Slides of Intact Soft-Agar Colony Cultures of Hematopoietic and Tumor Stem Cells. Cancer Research 39, 1133-1136 (1979)

53. Salmon, S.E. (ed): Clinical correlation of drug sensitivity. In: Cloning of human tumor stem cells.

New York: Alan R. Liss, 265-285 (1980)

54. Sanfilippo, O., Daidone, M.G., Costa, A., Canetta, R. and Silvestrini, R.: Estimation of Differential In Vitro Sensitivity of Non-Hodgkin Lymphomas to Anticancer Drugs. Europ. J. Cancer 17, 217-226 (1981)

55. Schlag, P., Schreml, W., Breitig, D., Betzler, M. und Herfarth, Ch.: Korrelation zwischen proliferationskinetischen in vitro - Untersuchungen und Krankheitsverlauf beim Mammacarcinom - Ansatz zur Individualisierung einer postoperativen Zusatztherapieplanung? Langenbecks Archiv für Chirurgie Supplement, 241-246 (1981)

56. Schmähl, D.: Wert und Gefahr der Krebs-Chemotherapie. Dtsch.med.Wschr. 88, 1463-1468 (1963)

57. Schmähl, D.: Nebenwirkungen der Therapie mit zytostatischen Arzneimitteln. Dtsch. Ärzteblatt 28, 2035-2036 (1969)

58. Schmidt-Matthiesen, H., Bastert, H.G., Michel, R.T., Nord, D., Gerner, R. und Sturm, R.: Prätherapeutische Testung menschlicher Tumoren gegen Cytostatika. In vitro-/ in vivo-Korrelation. Arch. Gynaekol. 224, 356 (1977)

59. Seeber,S. und Schmidt, C.G.: Zum Problem der prätherapeutischen Sensibilitätsbestimmung von Tumoren durch Inkorporationsstudien in vitro. Klin.Wschr. 55, 1127-1136 (1977)

60. Seidel, H.J. und Wegner, L.A.: Zur Sensibilitätsbestimmung von Tumoren in vitro I. Vergleichende Untersu-

chungen am Jensen-Sarkom in vivo und bei 1-stündiger Inkubation in vitro. Z. Krebsforsch. 72, 105-118 (1969)

61. Sky-Peck, H.H.: Effects of Chemotherapy on the Incorporation of 3H-Thymidine Into DNA of Human Neoplastic Tissue. Nat. Cancer Inst. Monogr. 34, 197-203 (1971)

62. Tchao, R., Easty, G.C., Ambrose, E.J., Raven, R.W. and Bloom, H.J.G.: Effect of Chemotherapeutic Agents and Hormones on Organ Cultures of Human Tumours. Europ. J. Cancer 4,39-44 (1968)

63. Thirlwell, M.P., Livingston, R.B., Murphy, W.K. and Hart, J.S.: A Rapid in Vitro Labeling Index Method for Predicting Response of Human Solid Tumors to Chemotherapy. Cancer Research 36, 3279-3283 (1976)

64. Toplin, I.: Experiences with the Tissue Culture System in Large-Scale Cancer Chemotherapy Screening. Cancer Research 21, 1042-1046 (1961)

65. Tsuruo, T.and Fidler, I.J.: Differences in Drug Sensitivity among Tumor Cells from Parental Tumors, Selected Variants and Spontaneous Metastases. Cancer Research 41, 2058-3064 (1981)

66. Van Putten, L.M., Lelieveld, P. and Kram-Idsenga, L.K.J.: Cell-Cycle Specificity and Therapeutic Effectiveness of Cytostatic Agents, Cancer Chemother. Rep. 56, 691-700 (1972)

67. Volm, M., Kaufmann, K., Hinderer, H. und Görttler, K.:

Schnellmethode zur Sensibilitätstestung maligner Tumoren gegenüber Cytostatika. Klin. Wschr. 48, 374-376 (1970)

68. Volm, M., Kaufmann, M., Wayss, K., Görrtler, K. und Mattern, J.: Gezielte Tumor-Chemotherapie durch Onkobiogramme. Dtsch. med. Wschr. 99, 38-43 (1974)

69. Volm, M., Mattern, H. and Wayss, K.: The Effects of Cytostatic Drugs on Transplanted Tumours. An Investigation of the Correlation between In Vivo and In Vitro Results. Arch. Geschwulstforsch. 43/2, 137-144 (1974)

70. Volm, M., Kaufmann, M., Mattern, J. and Wayss, K.: Sensitivity Tests of Tumours to Cytostatic Agents. I. Comparative Investigations on Transplanted Tumours in vivo and in vitro. Z. Krebsforsch. 83, 85-96 (1975)

71. Volm, M., Kaufmann, M., Mattern, J. and Wayss, K.: Möglichkeiten und Grenzen der prätherapeutischen Sensibilitätstestung von Tumoren gegen Zytostatika im Kurzzeittest. Schweiz. med.Wschr. 105, 74-82 (1975)

72. Volm, M., Kaufmann, M., Wayss, K. und Mattern, J.: Resistenztestung von menschlichen Tumoren im Kurzzeit-Test. Klin.Wschr. 53, 579-580 (1975)

73. Volm, M. und Ehrhart, H.: Resistenztestung maligner Tumoren. Editorial. Münch. med. Wschr. 119, 7-8 (1977)

74. Volm, M. and Lindner, C.: Detection of Induced Resistance in Short-Term-Tests. Z. Krebsforsch. 91, 1-10 (1978)

75. Volm, M., Wayss, K., Kaufmann, M. and Mattern, J.:

Pretherapeutic Detection of Tumour Resistance and the Results of Tumour Chemotherapy. Europ. J. Cancer 15, 983-993 (1979)

76. Volm, M., Maas, E. and Mattern, J.: Detection of Induced Resistance to Cytosine-Arabinoside with a Short-Term-Test. Europ. J. Cancer 16, 733-736 (1980)
77. Warnecke, P. und Seeber, S.: Angriffspunkte von Vinca-Alkaloiden im Protein- und Nucleinsäurestoffwechsel. Z. Krebsforsch. 71, 361-367 (1968)
78. Wayss, K., Mattern, J., Volm. M. und Zimmerer, J.: Der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin als Maß für die Wachstumsgeschindigkeit von Tumoren. Arch. Geschwulstforsch. 44/4, 307-311 (1974)
79. Willnow, U.: Die Bedeutung von Zellkinetik und Zystostatika- Sensibilitätstestung von Neuroblastomen, Rezidivtumoren und Tumormetastasen. Z. Kinderchir. 33, 110-121 (1981)
80. Wilson, A.P. and Neal, F.E.: In Vitro Sensitivity of Human Ovarian Tumours to Chemotherapeutic Agents. Br.J. Cancer 44, 189 (1981)
81. Wolberg, W.H. and Brown, R.R.: Autoradiographic Studies of in Vitro Incorporation of Uridine and Thymidine by Human Tumor Tissue. Cancer Research 22, 1113-1119 (1962)
82. Wright, J.C., Cobb, J.P., Gumport, S.L., Golomb, F.M. and Safadi, D.: Investigation of the Relation between Clinical and Tissue-Culture Response to Chemo-

therapeutic Agents on Human Cancer. N.Engl.J. Med. 257, 1207-1211 (1957)

83. Wüst, G.P. und Matthes, K.J.: In vitro-Messung des Einbaues von 3H-Thymidin in Jensen Sarkom unter Cytostaticaeinwirkung mit Hilfe der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie. Z.Krebsforsch. 73, 204-214 (1970)

84. Yarnell, M., Ambrose, E.J., Shepley, K. and Tchao, R.: Drug Assays on Organ Cultures of Biopsies from Human Tumours. Brit. med. J. 2, 490-491 (1964)

85. Yesair, D.W., Thayer, P.S., McNitt, S. and Teague, K.: Comparative Uptake, Metabolism and Retention of Anthracyclines by Tumors Growing In Vitro and In Vivo. Europ. J. Cancer 16, 901-907 (1980)

86. Zittoun, R., Bouchard, M., Facquet-Danis, J., Percie-Du-Sert, M. and Bousser, J.: Prediction of the Response to Chemotherapy in Acute Leukemia. Cancer 35, 507-513 (1975)

Ich danke meinem Doktorvater
Herrn Dr. med. K. Possinger
für die Überlassung des Themas;
des weiteren gilt mein Dank
Herrn Prof. Dr. med. H. Ehrhart
für sein Votum
sowie den Damen
E. Doischer,
L. Dörrer,
C. Misera und
B. Wollsdorf
für ihre freundliche medizinisch-technische Assistenz.

Lebenslauf

Als erster Sohn des Notars Raimund Wetlitzky und seiner Ehegattin, der Hausfrau Justine Wetlitzky, geb. Unger, wurde ich am 8. Juni 1957 in Göggingen/Kreis Augsburg geboren. Vom Herbst 1963 bis Sommer 1967 besuchte ich die Volksschule in Cham/Oberpfalz und trat dann auf das dortige Joseph-von-Fraunhofer-Gymnasium über. Im Sommer 1969 wechselte ich auf das Max-Planck-Gymnasium in München-Pasing, wo ich 1976 die Reifeprüfung ablegte. Anschließend studierte ich ein Semester Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Im Sommersemester 1977 begann ich hier das Studium der Humanmedizin und legte im Sommer 1982 den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Die drei Tertiale des Praktischen Jahres leistete ich in der Radiologischen Klinik und Poliklinik, der Medizinischen Klinik III sowie der Chirurgischen Klinik und Poliklinik im Klinikum Großhadern der Universität München ab. Den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestand ich am 2. November 1983, die Approbation als Arzt erhielt ich am 4. November 1983.